

HPLC의 이동상 용매 Gradient Elution에 따른 인삼 Ginsenoside 12종의 최적 분석 조건
부산대학교 생명자원과학대학 : 박지영, 이충열*, 오동주
PNU-IGB 연구소: 이충열, 중부대학교 : 원준연

**The Analytical Optimum of Ginsenosides according to the Gradient Elution
of Mobile Phase by High Performance Liquid Chromatography**

Pusan National Univ. : Dong-Joo Oh, Chung-Yeol Lee*, Ji-Yeong Park, Sung-Man Kim,
Joongbu Univ. : Jun-Yeon Won , PNU-IGB : Chung-Yeol Lee*

실험목적

인삼 ginsenoside의 분석은 많이 시도되어 왔으나, 최근 HPLC를 이용한 G-분석이 이루어지고 있으나, 주요 사포닌 및 미량 사포닌의 분석법이 정립되지 않고 있는 실정인 바, 본 연구에서는 이동상 용매의 기울기 용리를 다양하게 변화를 주어 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂의 총 12종의 사포닌을 양호하게 분리하는 방법을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용한 고속 액체크로마토그래피(HPLC)는 Perkin elmer series 200 Pump, Peltier column oven, UV/VIS Detector, Vacuum Degasser, 그리고 Series 600 LINK를 연결하여 사용하였고 HPLC의 Column은 ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6×150mm, 5-Micron)을 사용하였다. 실험에 이용된 모든 시약 H₂O와 CH₃CN, CH₃OH 모두 SK Chemical의 Burdick & Jackson 제품(HPLC grade)을 사용하였으며, HPLC 분석에 사용된 표준품은 시중에서 판매하는 Sigma(USA)와 EXTRASYNTHESE(France)의 제품을 사용하였다.

실험에서 기기의 조건은 peak의 분리를 위해 pump program에서 gradient를 준 것과 Detector time의 변화를 준 것 외에는 모두 동일한 조건에서 실험을 하였다. 이동상 용매의 다양한 기울기 용리 조건은 Table 1에 나타난 바와 같다.

실험결과

1. 본 연구에서는 이동상 용매의 기울기 용리를 다양하게 변화를 주어 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂의 총 12종의 사포닌을 양호하게 분리하는데 성공하였다.(fig. 2) 이동상의 흐름 속도는 1.00ml/min이고 column 온도는 35°C, UV detector의 파장은 203nm로 모두 일정하게 한 결과였으며, 최적의 분석조건은 H₂O와 CH₃CN의 용매 조성이 82/18, 70/30, 55/45, 50/50으로 각각의 ginsenosides의 안정적인 Area 값을 얻을 수 있었다.
2. 사포닌 표준품 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂을 10μl씩 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 농도와 피크 면적을 계산한 값은 Table 2 및 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 12종의 사포닌 표준품은 모두 고도로 유의한 1차회귀식을 만족시키고 있는데, Rh₂가 가장 넓은 면적을 차지하고 있었고, Rd가 가장 좁게 나타났다.

본 연구는 부산대학교 대학구조개혁지원사업비의 PNU-IGB 국제공동연구소 연구과제로 수행함.

* 주저자 연락처(Corresponding author): 이충열 E-mail: cylee@pusan.ac.kr Tel: 055-350-5503

Table 1. Changes of HPLC gradient elution on the separation for mixture of ginsenosides-Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂.

	Step	Time	Water	ACN	Curve		Step	Time	Water	ACN	Curve
A	0	Initial	80.0	20.0	0.0	D	0	Initial	82.0	18.0	0.0
	1	22.0	80.0	20.0	1.0		1	22.0	82.0	18.0	0.0
	2	40.0	50.0	50.0	1.0		2	32.0	70.0	30.0	1.0
	3	50.0	45.0	55.0	1.0		3	70.0	55.0	45.0	1.0
B	0	Initial	82.0	18.0	0.0	E	0	Initial	82.0	18.0	0.0
	1	20.0	82.0	18.0	0.0		1	22.0	82.0	18.0	0.0
	2	30.0	70.0	30.0	1.0		2	32.0	75.0	25.0	1.0
	3	60.0	60.0	40.0	1.0		3	60.0	60.0	40.0	1.0
C	0	Initial	82.0	18.0	0.0	F	0	Initial	82.0	18.0	0.0
	1	22.0	82.0	18.0	0.0		1	22.0	82.0	18.0	0.0
	2	37.0	70.0	30.0	1.0		2	32.0	70.0	30.0	1.0
	3	70.0	50.0	50.0	1.0		3	60.0	55.0	45.0	1.0
						4	85.0	50.0	50.0	0.0	

Table 2. Quantitative analysis data.

Ginsenoside	Calibration curve	Regression coefficient
Rb ₁	$y = 4033.8x + 29.787$	0.9986
Rb ₂	$y = 6468.2x + 34.852$	0.9995
Rb ₃	$y = 5481.4x + 31.372$	0.9994
Rc	$y = 5013x + 21.147$	0.9996
Rd	$y = 3664.1x + 13.84$	0.9997
Re	$y = 5976x + 17.638$	0.9997
Rf	$y = 8051.4x + 39.289$	0.9996
Rg ₁	$y = 5251x + 16.528$	0.9997
Rg ₂	$y = 10080x + 46.403$	0.9996
Rg ₃	$y = 8984.4x + 36.79$	0.9997
Rh ₁	$y = 9146.9x + 44.175$	0.9996
Rh ₂	$y = 11068x + 19.334$	0.9999

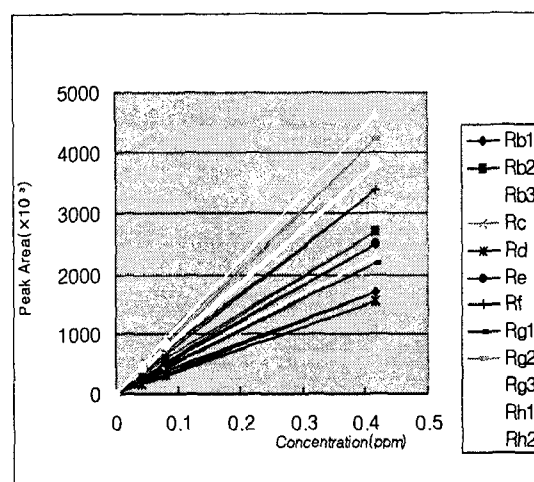


Fig. 1. Calibration lines of

ginsenoside.

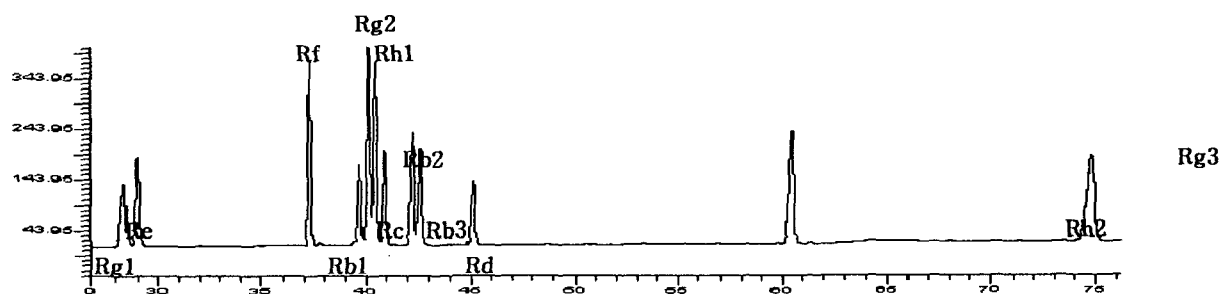


Fig. 2. HPLC Chromatogram of ginsenosides by the condition of optimum.